

BEST AVAILABLE COPY

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年12月20日 (20.12.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/95710 A1

(51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 37/08, 17/00, C12N 15/57 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 水谷 仁 (MIZUTANI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒 514-0046 三重県津市大園町10-41 Mie (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05110 (74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al); 〒 103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年6月15日 (15.06.2001) (81) 指定国 (国内): JP, US.

(25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-181134 2000年6月16日 (16.06.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中西憲司 (NAKANISHI, Kenji) [JP/JP]; 〒665-0877 兵庫県宝塚市中山桜台7-7-7 Hyogo (JP). 大鵬薬品工業株式会社 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8444 東京都千代田区神田錦町1-27 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 國際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: CASPASE 1 GENE TRANSFER ANIMAL

(54) 発明の名称: カスパーゼ1遺伝子導入動物

(57) Abstract: A transgenic non-human mammal having a DNA which carries a DNA having a foreign caspase 1 gene integrated thereto in such a manner as being skin-specifically expressed or its offspring. Because of spontaneously suffering from atopic dermatitis in the absence of any specific pathogenic microorganism, the above transgenic non-human mammal is useful as a disease model animal. Use of the transgenic animal makes it possible to develop preventives and remedies for atopic dermatitis based on natural immunity and to clarify the onset mechanism of atopic diseases.

(57) 要約:

外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

A1 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、特異的病原微生物の非存在下で自然発症的にアトピー性皮膚炎を発症するので疾患モデル動物として有用である。本発明のトランスジェニック動物を用いれば、自然免疫によるアトピー性皮膚炎の予防治療用医薬の開発、さらにはアトピー性疾患の発症メカニズムの解明

WO 01/95710 A1

明細書

カスパーゼ1遺伝子導入動物

技術分野

本発明は、アトピー性皮膚炎モデル動物として有用なトランスジェニック動物に関する。

背景技術

アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎等のアトピー性疾患は正常人が反応しない環境抗原等に対して過敏に反応を示し、自己の免疫系による各臓器の破壊、障害を生ずる疾患である。これらの疾患の発生機序にはアレルギー反応を増強するTh2型サイトカインの関与が想定されている。その誘導機序、調節機序の解明は生理学及び薬学上重要な意味を持つが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

現在、アトピー性疾患の治療には主として、抗原からの回避、ヒスタン等のメディエーターの受容体の結合に拮抗する抗ヒスタミン剤、抗炎症ステロイド剤等によるものが知られているが、より特異的な作用機序をターゲットとした治療方法の開発は、適切な実験動物がないことにより妨げられている。

従来、実験動物にアレルギー反応を誘発させるためには、予め抗原乃至アレルゲンを繰り返し免疫することにより動物を感作しておいてから当該抗原乃至アレルゲンを投与する必要があった。この場合、同時に多数の動物を感作するのは多大な労力を要するばかりでなく、個々の動物間に反応性のばらつきが生じることがあり、実験の再現性の上で問題となることがあった。

近年、NC/Ngaマウスがアトピー性皮膚炎のモデル動物として注目されているが、このマウスに起こる皮膚炎はダニ存在下で初めて発症するもので、その発症

率も不安定であり、症状も一定しない。

アトピー性疾患の治療薬の開発には動物実験が不可欠で、特にアトピー性皮膚炎のモデル動物が希求されているが、遺伝的背景が確立され、免疫学的にも明らかで、特異的病原微生物を排除した条件下で各種治療法及び薬剤の開発研究に利用可能なアトピー性皮膚炎モデル動物は現在のところ存在せず、実用に供されていない。

従って、本発明の目的は、アトピー性皮膚炎モデルとして有用な動物を作製することにある。

発明の開示

そこで本発明者らはインターロイキン18（IL-18）に着目した。IL-18は、カスパーーゼ1（IL-1 β 変換酵素）と呼ばれるプロテアーゼによってプロセシングを受けて前駆型から成熟型に変換される。成熟型のIL-18の機能としては、（1）IFN- γ 産生の誘導、（2）Fasリガンド発現の増強によるFas介在性アポトーシスの増強、（3）GM-CSFの誘導、（4）IL-12との共存によるIgE産生抑制等が知られている。また、IL-18は免疫組織以外の骨芽細胞様間質細胞、ケラチノサイト、小腸上皮細胞、副腎皮質細胞、下垂体細胞といったさまざまな組織でも発現されており、その生理学的な役割について活発な研究が行われている（免疫1997-98、中山書店、62-72；臨床免疫、30(2)、191-198、1998等参照）。近年、発明者等はIL-18単独で過剰発現した場合は、IL-4及びIL-13の産生を増強し、IgE産生を誘導する知見を得た。このことは、IL-18がアトピー性疾患の発症に関係するTh2型サイトカインに深く関与していることを意味する。従って、IL-18を成熟型に変換するカスパーーゼ1の分泌が促進されたモデル動物が作製されれば、アトピー性疾患の発症メカニズムの解明、治療法の開発に有用であると考えた。しかし、カスパーーゼ1はアポトーシス誘導酵素であるため、単にこの遺伝子を導入して生体内で発現させると致死的になるという問題があった。また、

成熟型IL-18を分泌させるには、前駆型IL-18を産生する細胞にカスパーゼ1が発現される必要があった。そこで、カスパーゼ1遺伝子を前駆型IL-18を産生しうる皮膚特異的に発現するようなDNAに組み換えて動物細胞に導入すれば、血中に持続的に成熟型IL-18を分泌し、ダニ、カビ類等の特異的病原微生物を排除した条件下において飼育してもアトピー性皮膚炎の症状を呈するトランスジェニック動物が作製できることを見出し、本発明を完成するに至った。なお、本発明者らは先にカスパーゼ1遺伝子を受精卵ではなく、正常マウスに直接注射してカスパーゼ1による細胞死と炎症を検討した（J. Dermatol. Sci. 21(1999) : 49-58）。しかし、このマウスは炎症を自然発症するものでなく、本発明動物とは全く異なる。

すなわち、本発明は、外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫、及びその作製方法を提供するものである。

また本発明は、上記トランスジェニック動物に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定することを特徴とするアトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニング方法、及び当該スクリーニングによりアトピー性皮膚炎の改善効果を有すると判定される物質を含有するアトピー性皮膚炎の予防又は治療用医薬を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、導入に用いた組み換えDNAの結合状態を示す図である。

図2は、KCASP1Tgの各種組織中におけるhproCASP1のmRNAの発現を、ノーザンプロット解析した結果を示す図である。

図3は、KCASP1Tgの皮膚中のhCASP1蛋白の発現を、抗hCASP抗体を用いてイムノプロット解析した結果を示す図である。

図4は、KCASP1Tgにおける血清中IL-18、IL-1 β 及びIL-1 α の濃度の変化を示す

図である。

図5は、KCASP1Tg及び正常マウスにおける皮膚搔破回数の測定結果を示す図である。

図6は、KCASP1Tgの血中のIgE及びヒスタミン濃度の経時変化を示す図である。

図7は、14週齢KCASP1Tg及び正常マウスの血中IgE濃度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のトランスジェニック動物は、体細胞及び生殖細胞に外来性のカスパーゼ1 (CASP1) 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有する。ここで外来性カスパーゼ1遺伝子としては、ヒト又はマウスのカスパーゼ1遺伝子が好ましく、例えばヒト前駆型カスパーゼ1 (hproCASP1) 、マウス前駆型カスパーゼ1 (mproCASP1) 、ヒトカスパーゼ1 (hCASP1) 、マウスカスパーゼ1 (mCASP1) 等の遺伝子が挙げられるが、hproCASP1の完全なコード領域の1.4 kb cDNAが特に好ましい。

外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAとしては、外来性カスパーゼ1遺伝子と皮膚特異的蛋白のプロモータとを含む組み換えDNAが好ましい。ここで、皮膚特異的蛋白のプロモータとしては、皮膚に特異的に存在する蛋白のプロモータが挙げられ、例えばケラチン14、ケラチン5、ケラチン1、ケラチン10、インボルクリン等のプロモータが挙げられるが、ケラチンプロモータが特に好ましい。外来性カスパーゼ1遺伝子は、皮膚特異的蛋白のプロモータの下流に結合されるが、このとき、遺伝子の発現効率を上げるため β -globin イントロン等のイントロンも結合するのが好ましい。

上記DNAは、遺伝子導入哺乳動物において、目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列 (ポリA、一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来、各種哺乳動物由来の各遺伝子の配列を用い

て遺伝子発現を操作することができる。好ましくは、前記皮膚特異的蛋白のポリA、特に好ましくはケラチンのポリAなどが用いられる。その他、目的の遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核遺伝子のイントロンの一部を、プロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

かくして得られる組み換えDNAを導入するための非ヒト哺乳動物としては、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなどが挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス又はラットであり、なかでも齧歯目 (Rodentia) が好ましく、とりわけマウスが好ましい。

本発明のトランスジェニック動物は、例えば非ヒト哺乳動物の受精卵に、前記外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを導入し、当該受精卵を当該動物の雌に着床させることにより作製される。ここで、受精卵としては、雄精前核時期（受精後約12時間位）のものが好ましい。また組み換えDNAの導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などが挙げられるが、マイクロインジェクション法が特に好ましい。

組み換えDNAを導入した受精卵は、当該受精卵と同様の動物の雌に着床させる。着床の手段は、偽妊娠雌性動物の卵管に人工的に移植、着床させる手段が好ましい。かくして、受精卵を着床させた動物から生まれた仔の中から、目的とする遺伝子を発現している個体を選別し、当該個体を継代すればよい。

得られたトランスジェニック動物に目的遺伝子が含まれているか否かの確認は、皮膚からDNAを採取し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 及びサザンプロッティング法による導入遺伝子の解析によって行うことができる。

かくして得られる本発明のトランスジェニック動物は、皮膚において外来性カスパーゼ1遺伝子が発現されるため、特異的病原微生物の非存在下でもアトピー性皮膚炎の症状を呈し、かつ長期間生存するという特徴を有する。

すなわち、本発明のトランスジェニック動物は、外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚のみに有し、他の組織、例えば肝臓、腎臓、肺、脳、脾臓では有さない。その結果、本発明のトランスジェニック動物の皮膚には、成熟型IL-18及び成熟型IL-1 β が含まれている。さらに本発明のトランスジェニック動物の血中には成熟型IL-18及び成熟型IL-1 β が正常動物に比べて大量含まれているが、その含有量は成熟型IL-1 β に比べて成熟型IL-18のほうが多い。

本発明のトランスジェニック動物は、8週齢ぐらいからアトピー性皮膚炎の症状を、例えば蚕食状皮膚炎、びらん性皮膚炎、皮膚潰瘍、びらんなどを呈する。また、皮膚組織の光学顕微鏡観察では、10週齢ぐらいから、潰瘍の周辺の厚い表皮には、錯角化症を伴った乾癬様あるいは表皮肥厚といった変化が生じ、潰瘍の真皮には、単核細胞ならびに肥満細胞の浸潤が生じる。傷害部位の角質細胞は、核凝縮を伴った好酸性壊死を示し、これは角質細胞のアポトーシスの徵候である。また、本発明のトランスジェニック動物は、正常動物に比べて極めて多くの皮膚搔破行動をくり返し、アトピー性皮膚炎特有の強い搔痒を伴うことがわかる。さらに、本発明のトランスジェニック動物は、血中のヒスタミンレベル及びIgEが極めて高いという、アトピー性皮膚炎特有の症状を示す。

このように本発明のトランスジェニック動物は、特異的病原微生物非存在下で、アトピー性皮膚炎の症状を呈するので、アトピー性皮膚炎の症状モデルとして有用である。すなわち、本発明のトランスジェニック動物又はその子孫に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定すれば、アトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニングが可能となる。ここで、アトピー性皮膚炎の改善効果は、前記血中成熟型IL-18レベルの測定、皮膚中の成熟型IL-18の検出、肉眼観察、皮膚組織の顕微鏡観察などを単独で又は適宜組み合せて検定すれ

ばよい。また当該スクリーニングによりアトピー性皮膚炎改善効果があると判定された被験物質はアトピー性皮膚炎の予防又は治療用の医薬として有用である。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

まず、実施例に用いた各種試験方法及び材料について説明する。

(1) ノーザンプロット法

マウスカスパーゼ1 (mCASP1) のcDNA (Cell, 75, 653-660 (1993) 参照) は、大阪大学（三浦博士）より入手した。全RNAは、後記実施例1により得られたCASP1トランスジェニックマウス (KCASP1Tg) 及びコントロールマウスの組織からIsogen試薬（ニッポンジーン社製）を使用して抽出した。ノーザンプロット解析では、10 µgの全RNAを2%ホルムアルデヒド／アガロースゲル電気泳動により、サイズを分画した。RNAをナイロン膜 (Immobilon-N、ミリポア社製) に移し、ヒト及びマウスのCASP1にそれぞれ対応する³²PでラベルしたcDNAをプローブに使用した（ヒトCASP1のcDNAについてはJ. Dermatol. Sci., 21 (1994), 49-58参照のこと）。ハイブリダイゼーションの後、プロットを42°C、1×SSC／0.1%SDSで2回、2×SSC／0.1%SDSで2回洗浄した。その後、プロットを-70°CでX線フィルムに露光した。

(2) サイトカイン、サイトカインアッセイ及び抗体

リコンビナントマウスIL-1 β (rmIL-1 β) は、R&D System社より購入した。ヒト前駆型IL-1 β (hproIL-1 β) は、J. Exp. Med. 174:821 (1991) に従い調製した。リコンビナントヒトIL-1 β (rhIL-1 β) 及び抗ヒトIL-1 β 抗体は大塚製薬より入手した。IL-1 α レベルはEndogen社製のELISAキットにより、IL-1 β 及びIFN- γ レベルは、R&D System社キットで測定した。IL-18の生物学的活性は、IL-18反応性マウスNK細胞を使用してIFN- γ 誘導活性で測定した。リコンビナン

トマウスIL-18 (r_mIL-18) 、ウサギ抗マウスIL-18中和抗体及びマウスIL-18ELISAキットは林原研究所より入手した。マウスIL-18ELISAキットでは10～1000 pg/mLのIL-18を検出可能であった。

(3) 免疫組織化学

トランスジェニックとワイルドタイプマウスからのバイオプシー標本は、りん酸緩衝ホルマリンで2時間固定した。次いで、パラフィン切片にカットした。サンプルは、直ちに、冷凍組織用包埋剤であるOCT compound (Miles社製) 中で、凍結し、-70℃で保存した。クリオスタットの部分 (5 μm) は、アセトンで5分間、4℃で固定し、適度に希釈した一次抗体で1時間インキュベートした。洗浄後、結合した一次抗体を基質としてAEC (ダコジャパン社製) を使用してVectastain Eliteキット (Vector Laboratories社製) で視覚化した。

(4) ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを介したdUTP-ビオチンニックエンドラベリング (TUNEL)

パラフィン切片中の皮膚バイオプシー標本のDNAフラグメンテーションは、Arch. Dermatol., 133:845 (1997) 記載のTUNEL染色によって、調べた。

(5) イムノプロット

イムノプロットはJ. Clin. Invest. 87:1066 (1991) に従って行った。Isogenキットを使用して、DNAとRNAを除去した後、トランスジェニックとコントロールマウスからの表皮の細胞ライセートを還元条件下、SDS-サンプルバッファーで懸濁した。電気泳動した蛋白質を、セミドライプロッター (Bio-Rad社製) を使用して二クロセルロース膜 (Scheicher & Schuell社製) に転写した。膜を一次抗体で1時間インキュベートした後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgGあるいは抗ウサギIgG抗体で二次インキュベートし、最後に、ウエスタンブルー基質 (Promega社製) で発色させた。

(6) 前駆型IL-1 β (proIL-1 β) プロセッシング活性

リコンピナントヒト前駆型IL-1 β (rhproIL-1 β) を新鮮な表皮ライセートと

とともに10～30分インキュベートした。SDS-サンプルバッファーを添加し直ちに煮沸した。サンプルを抗ヒトIL-1 β 抗体及びウエスタンブルー検出キット(Promega社製)を使用したイムノプロットにより分析した。

実施例 1

(1) DNA構成及びトランスジェニックマウスの作製

hproCASP1の完全なコード領域の1.4 kb cDNAを、ヒトケラチン14プロモーター(シカゴ大学、E. Fuchs博士より入手(Nature, 374, 159-162(1995)参照))及びウサギ β -globinイントロン(京都大学、田中博士より入手(Nature, 374, 159-162(1995)参照))に平滑末端ライゲーションによって結合させた(図1:図1中、K14 promoterはヒトケラチン14プロモーターを、 β -glob. Int.はウサギ β -globinイントロンを、1.4 kb hproCASP1はヒト前駆型カスパーゼ1の1.4 kb cDNAを、K14 polyAはヒトケラチン14ポリAを示す)。得られたDNAフラグメントをC57BL/L6マウス(日本チャールスリバー社)の受精卵へDev. Growth Differ., 39:257(1997)記載の方法に準じてマイクロインジェクション法により注入した。

(2) トランスジェニックマウスにおける皮膚でのhCASP1過剰発現の確認

尾部皮膚からのDNAを使用したPCR及びサザン blotting法による導入遺伝子の取り込みによって仔をスクリーニングした。トータル96匹の誕生したマウスのうち4匹(♂3、♀1)がhCASP1のトランスジェニックであった(以下、KCASP1Tgと略す)。KCASP1Tgは、誕生時には健康で、その後正常に成長したが、8週齢前においては同腹児のワイルドタイプより小さかった。この時点以後、KCASP1Tgは慢性活動性皮膚炎の症状が明確に発現した。3匹の♂KCASP1Tgのうちの1匹は、ワイルドタイプ♀と交配させた結果、♂:♀=1:1でKCASP1Tgとワイルドタイプの仔が誕生した。すべての実験は、非トランスジェニックやワイルドタイプ同腹児と導入遺伝子のライン化されたヘテロ接合体との比較で行った。

(3) 皮膚の症状

KCASP1Tgは、特別な病原体の検出されない条件のもとで8週から、目の周りの中程度の蚕食状皮膚炎が著明となり、急速に重度のびらん性皮膚炎に進展した。また、時折皮膚潰瘍が認められた。これらの症状は、その後1、2週間に顔、耳、首、胴体、足に広がった。その後再上皮化が起こり、一部のみに苔癬型皮膚炎 (lichenoid dermatitis) が発症し、びらん及び潰瘍がぶり返した。16週後、複数の皮膚病巣が形成され、耳とまぶたは変形した。顔及び四肢の毛は、多数の瘢痕を伴った外皮のみを残して消失した。

光学顕微鏡レベルでは、KCASP1Tgの表皮は、6週まで特に組織学的变化は認められなかった。10週齢のKCASP1Tgの潰瘍の周辺の厚い表皮は、錯角化症を伴った乾癬様变化ならびに部分的に表皮肥厚を伴った皮膚炎が認められた。潰瘍の真皮には、多くの単核細胞が浸潤していた。傷害部位の角質細胞は、核凝縮を伴った好酸性の壊死を示し、これは角質細胞のアポトーシスの徵候である。実際、多くの角質細胞を含む皮膚傷害部位ではそれらの核がDNAのフラグメンテーションの同定に用いられるTUNEL染色によってポジティブに染まった。一方、コントロールの同腹児の皮膚ではTUNEL陽性角質細胞は認められなかった。

高レベルのhCASP1が、KCASP1Tgの厚い表皮組織中で検出された。一方、コントロールのマウスではそれは検出されなかった。これらの潰瘍が、外因性hCASP1により内因性前駆型IL-18からプロセッシングされた成熟型IL-18により誘導された機能的Fasリガンド (Fas-L) の作用によるものかどうかを確かめるために、皮膚変化開始前のKCASP1TgにFas-L中和抗体を投与した。具体的には、J. Exp. Med., 182:1777(1995)記載の方法に準じて、1mgのFas-L中和抗体 (MFL1、順天堂大学樋垣博士より入手) をKCASP1Tgに5週から9週の間の毎週、腹腔内に注入し、皮膚潰瘍の状態を観察した。しかしながら、このような抗Fas-L中和抗体での集中的な処理によっても皮膚潰瘍は進展した。従って、角質細胞のアポトーシスは Fas/Fas-L経路の作用には非依存的に誘導されることが示唆された。IL-1 β は、検討したどのセルラインや初代培養細胞においてもアポトーシスを誘導しなかつ

た。さらに、角質細胞特異的なIL-1 α トランスジェニックマウスは、アポトーシス的な皮膚潰瘍を示さなかった。これはその機能がIL-1 α と同様であるIL-1 β がKCASP1Tgの皮膚アポトーシスに関与していないことを示唆している。

(4) 皮膚における成熟型hCASP1の検出

ノーザンプロット解析により、KCASP1Tgの耳表皮、背部表皮、肝臓、腎臓、結腸、肺、脳及び脾臓におけるhproCASP1のmRNAを測定した(図2参照)。結果、1. 4 kb hproCASP1のmRNAは、KCASP1Tgの耳及び背部表面にのみ認められたが、他の組織(肝臓、腎臓、結腸、肺、脳及び脾臓)では認められなかった。なお、図2中、レーン1は非トランスジェニックの同腹児からの試料、レーン2~9はそれぞれKCASP1Tgの耳表皮組織、背部表皮組織、肝臓、腎臓、結腸、肺、脳、脾臓中のhproCASP1のmRNAの検出結果を示す。

一般的に、カスパーゼはそれらの生物学的活性を発揮するためには、適当なプロセッシングを必要とする。前駆型CASP1は、in vitroで、成熟型CASP1を形成するために自己タンパク分解を起こすと報告されている(Molecular Cell, 1:319 (1998)、J. Biol. Chem., 271:13273(1996)参照)。KCASP1Tgは、皮膚で自然に活性化されたhCASP1含んでいることを示唆している。この可能性を確かめるために、KCASP1Tgの皮膚ライセート中のhCASP1蛋白質のサイズを抗hCASP1抗体を用いたイムノプロット解析により測定した(J. Biol. Chem., 271:13273(1996)参照)。図3に示したように、皮膚ライセートは、hCASP1の両方の活性型成分(p20及びp10)とp45の前駆体を含み、一方、ワイルドタイプ同腹児からの皮膚ライセートはこれらの成分を含んでいなかった。この結果から、KCASP1Tgの皮膚のhCASP1は自然に成熟型に切断されていることが示された。なお、図3中、レーン1は陽性コントロールTHP-1細胞、レーン2は組み換えp20/p10 hCASP1、レーン3はKCASP1Tg皮膚ライセート、レーン4はワイルドタイプ皮膚ライセートである。

次に、KCASP1Tg皮膚中のhCASP1プロセッシング活性をin vitro基質として前駆

型IL-1 β を使用して試験した。KCASP1Tg表皮ライセートは、31kDリコンビナントhproIL-1 β を成熟型17kDへ切断した。この切断は、合成CASP1阻害剤及びヨードアセタミドにより阻害された。

さらに、KCASP1Tg皮膚中のhCASP1が、in vivoでその生物学的活性を及ぼすかどうかを検討した。ケラチノサイトは、mRNAレベルで定常的に、IL-1 β とIL-18を発現しているので、皮膚中の蛋白質レベルでの両方のサイトカインのサイズを測定した。KCASP1Tg皮膚ライセートは、成熟型IL-18と成熟型IL-1 β の両方を含んでいたがワイルドタイプは発現していなかった。これはトランスフェクトしたhCASP1が自発的な活性化を通じて自発的に内因性の前駆型IL-1 β と前駆型IL-18を切断したものと考えられる。

(5) 血中におけるIL-18レベル

外因性hCASP1による局所でのIL-18とIL-1 β の活性化が、それぞれの成熟型のサイトカインの全身性の蓄積をもたらすのかどうかを検討した。図4に示すように、高レベルのIL-18が有意に誕生後4週でKCASP1Tgの血清中で認められた。対照的に、ワイルドタイプの同腹児では、生存期間中を通じて、血清中でのIL-18のレベルは、低かった(0: 1ng/mL以下)。KCASP1Tgの血清IL-18濃度は、成長とともに徐々に上昇した。対照的に、KCASP1Tgの血清中IL-1 β は、12週からのみ少量検出され、ワイルドタイプでは検出されなかった。ケラチノサイトでのhCASP1の過剰発現は、IL-1 β よりIL-18の血清中濃度をより選択的に上昇させていた。

KCASP1Tgの血清中IL-18が成熟型IL-18であることを確かめるために、KCASP1Tgの血清中IL-18の生物学的活性を検討した。その結果、KCASP1Tgからの血清は、IL-18反応性のクローニングされたナチュラルキラー細胞によるIFN- γ 産生を誘導する能力があることがわかった。さらに、このIFN- γ 誘導能力は、抗IL-18抗体(中和抗体)により完全に阻害された。これは、KCASP1Tgの血清中に活性型IL-18を含んでいることを意味する。しかしながら、IFN- γ は定常状態では、

KCASP1Tgの血清中には検出されなかった。このように、KCASP1Tgは循環血中に持続的に成熟型IL-18を分泌していた。

(6) トランスジェニックマウスの皮膚搔破行動

目視法に従ってKCASP1Tg及び正常マウス（C57BL/6マウス）における皮膚搔破回数を40分間測定した。

その結果、図5に示すように、正常マウスの搔破回数は10分間あたり50回以下であるのに対し、KCASP1Tgのそれは10分間あたり200回以上であり、本発明のトランスジェニックマウスには痒みを伴う強い皮疹が生じていることがわかった。

(7) 血中におけるIgE及びヒスタミンレベル

KCASP1Tgの血中IgE濃度（RIA法）及びヒスタミン濃度（ELISA法）を経時的に測定した。その結果を図6に示す。また、14週齢におけるKCASP1Tg及び正常マウスの血中IgE濃度を測定した。その結果を図7に示す。これらの結果より、本発明のトランスジェニックマウスは、血中ヒスタミンレベルが13～14週で2000nMもの高値となり、また血中IgEレベルも16週齢で50μg/ml以上と極めて高値となることがわかる。

産業上の利用可能性

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、特異的病原微生物の非存在下で自然発症的にアトピー性皮膚炎を発症するので疾患モデル動物として有用である。本発明のトランスジェニック動物を用いれば、自然免疫によるアトピー性皮膚炎の予防治療用医薬の開発、さらにはアトピー性疾患の発症メカニズムの解明が可能となる。

請求の範囲

1. 外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。
2. 外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAが、外来性カスパーゼ1遺伝子と皮膚特異的蛋白のプロモータとを含むDNAである請求項1記載の動物又はその子孫。
3. 皮膚特異的蛋白のプロモータが、ケラチンプロモータである請求項2記載の動物又はその子孫。
4. 持続的にアトピー性皮膚炎を生ずるものである請求項1～3のいずれか1項記載の動物又はその子孫。
5. 血中に持続的に成熟型IL-18を分泌するものである請求項1～4のいずれかに記載の動物又はその子孫。
6. 請求項1～5のいずれか1項記載の動物又はその子孫に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定することを特徴とするアトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニング方法。
7. 請求項6記載のスクリーニング方法によりアトピー性皮膚炎の改善効果を有すると判定される物質を含有するアトピー性皮膚炎の予防又は治療用医薬。
8. 非ヒト哺乳動物の受精卵に、外来性のカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを導入し、当該受精卵を当該動物の雌に着床させることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の動物又はその子孫の作製方法。

図1

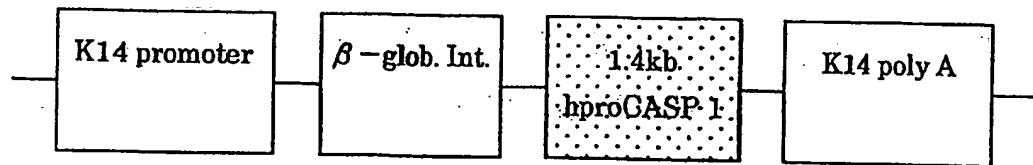


図2



図3

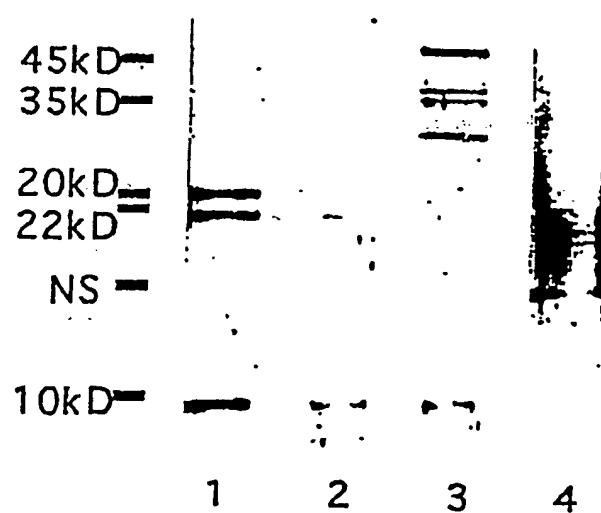


図4

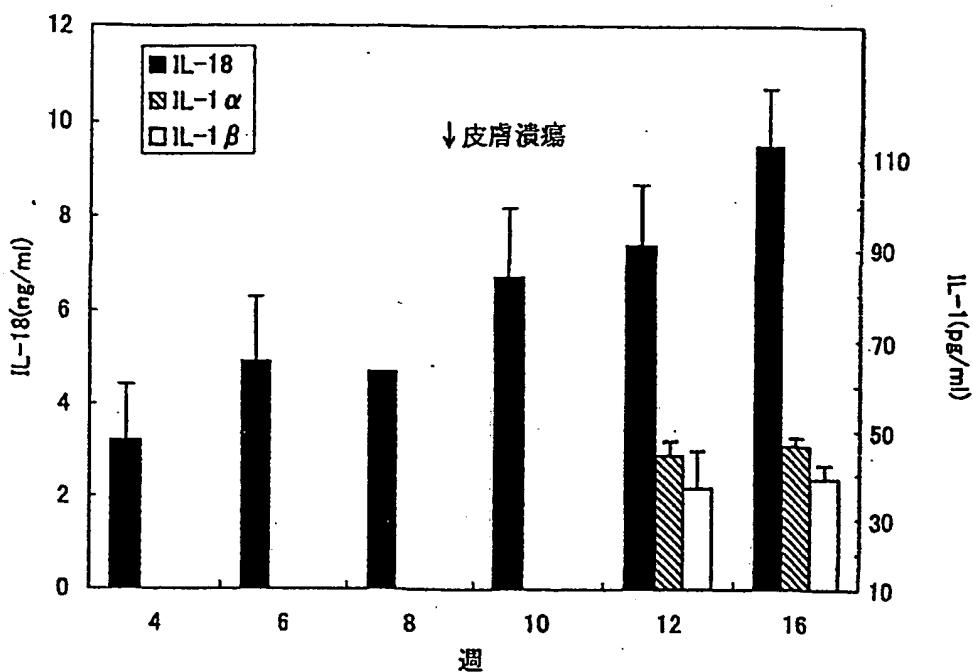


図5

皮膚搔破回数(回/10分)

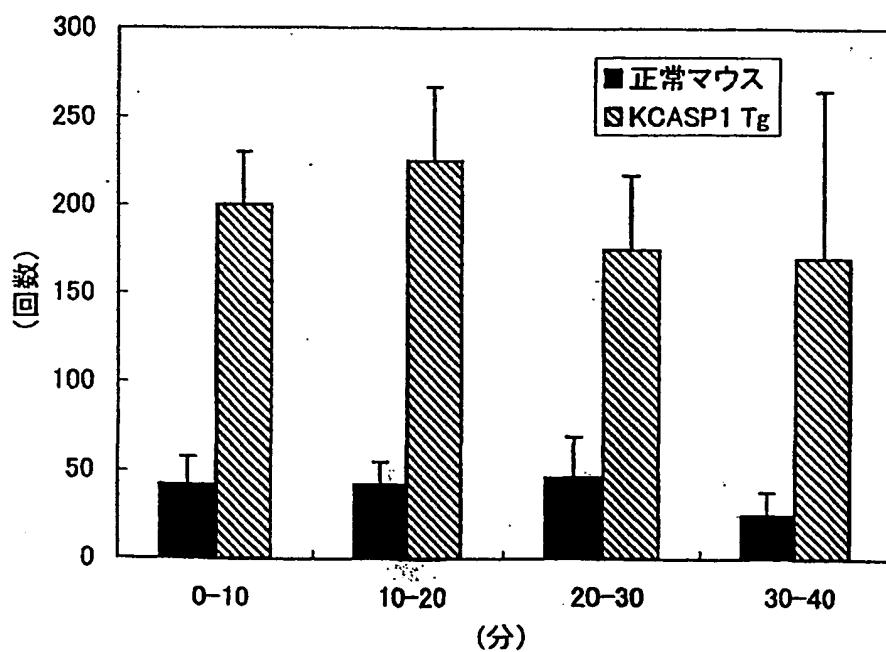


図 6

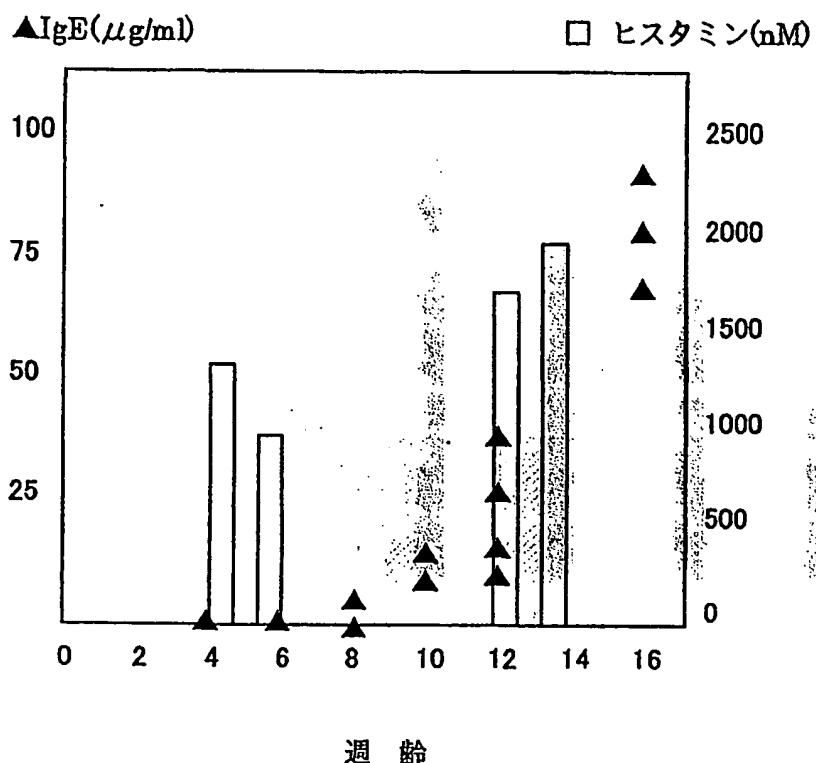
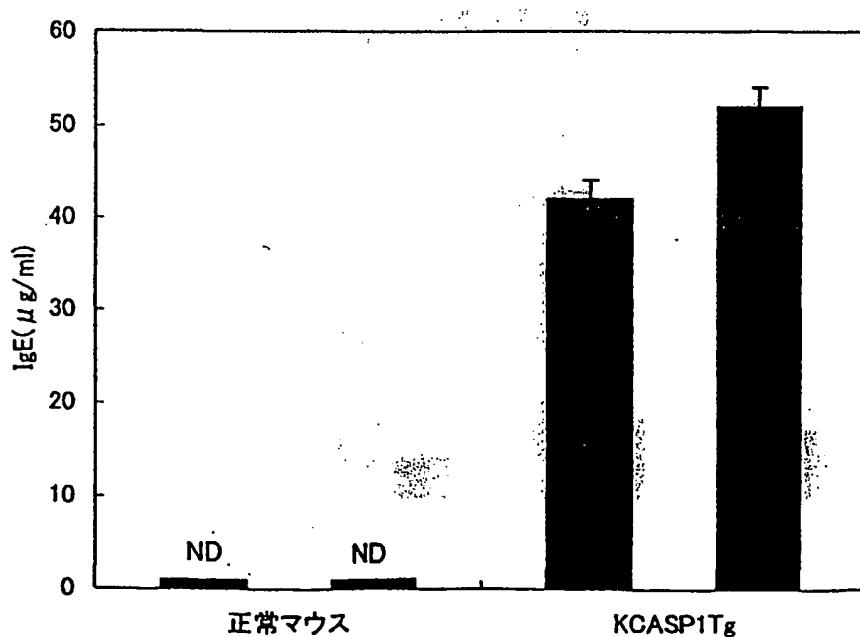


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 37/08, A61P 17/00, C12N 15/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 37/08, A61P 17/00, C12N 15/57

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, BIOTECHABS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	YAMANAKA K. et al., Journal of Immunology, Vol.165, pages 997 to 1003, (2000)	1-6,8
A	ASAHI A. et al., J. Dermatol., Vol.21, pages 49 to 58, (1999)	1-6,8
A	WARDLOW S. et al., DNA Seq., Vol.10, pages 133 to 137, (1999)	1-6,8
A	NASIR A. et al., J. Clin. Invest., Vol.94, pages 892 to 898, (1994)	1-6,8
A	SANSONETTI P. J. et al., Immunity, Vol.12, pages 581 to 590, (2000)	1-6,8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 September, 2001 (03.09.01)Date of mailing of the international search report
09 October, 2001 (09.10.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05110

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 7 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is not sufficiently supported by the description what particular compounds fall within the scope of the "preventives or remedies" as set forth in claim 7.

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/05110

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. ' A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 37/08,
A61P 17/00, C12N 15/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. ' A01K 67/027, A61K 45/00, A61P 37/08,
A61P 17/00, C12N 15/57

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, BIOTECHABS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	YAMANAKA K. et al., Journal of Immunology, vol. 165, pp. 997-1003 (2000)	1-6, 8
A	ASAHI A. et al., J. deamatol., vol. 21, pp. 49-58 (1999)	1-6, 8
A	WARDLOW S. et al., DNA Seq., vol. 10, pp. 133-137 (1999)	1-6, 8
A	NASIR A. et al., J. Clin. Invest., vol. 94, pp. 892-898 (1994)	1-6, 8
A	SANSONETTI P.J. et al., Immunity, vol. 12, pp. 581-590 (2000)	1-6, 8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.09.01

国際調査報告の発送日

09.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子

2B 9123

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/05110

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. 請求の範囲 7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲7の「予防又は治療用医薬」は具体的にどのような化合物であるのか、明細書によって十分に裏付けられていない。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがかかった

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.